

TSKgelバイオアシストCo²⁺-キレートクロマトグラフによる His-tag-NusGタンパク質の精製

藤井 豊¹, 木元 久², 平野聡子³

医学科生命情報医科学講座¹ 分子生命化学, ²分子遺伝学, ³病態制御医学講座小児科

Purification of His-tag-NusG Protein by TSKgel BioAssist Co²⁺-Chelate Chromatography

FUJII, Yutaka¹, KIMOTO, Hisashi² and HIRANO, Satoko³

*Division of Molecular Biology and Chemistry, Department of Biochemistry and
Bioinformative Sciences, Faculty of Medical Sciences, University of Fukui¹*

*Division of Molecular Genetics, Department of Biochemistry and Bioinformative
Sciences, Faculty of Medical Sciences, University of Fukui²*

*Division of Pediatrics, Department of General Medicine, Faculty of Medical
Sciences, University of Fukui³*

Abstract :

By TSKgel BioAssist Co²⁺-Chelate Chromatography using a linear gradient of imidazole, His-tag-NusG protein was purified as a monomer, dimer, trimer and tetramer eluting on 85, 130, 170 and 200 mM imidazole, respectively. These oligomers were estimated to be under a chemical equilibrium to each other. These results were not obtained by a step-wise elution with a high concentration of imidazole. On the other hand, the linear gradient elution mode was demonstrated to be useful for separation of the monomer and oligomers.

Key Words : Co²⁺, chelate, chromatography, his-tag

(Received 23 August, 2004 ; accepted 9 November, 2004)

要旨

TSKgelバイオアシストCo²⁺-キレートカラムを用いてイミダゾールの直線的濃度勾配法によりHis-tag-NusGタンパク質は、イミダゾール濃度85mMで単量体、130mMで2量体、170mMで3量体、そして200mMで4量体としてそれぞれ分離精製された。これらオリゴマーの間に化学平衡が成立していることが判明した。濃度勾配法により、ステップワイズ法では得られない、単量体～オリゴマーの分離精製が可能であることが証明された。

まえがき

大腸菌で大量発現したタンパク質を簡便な操作で精製できるように、しばしば目的タンパク質のN末端あるいはC末端にいくつかのヒスチジン残基からなるHis-tagを付けた融合タンパク質とする。このHis-tag-タンパク質⁽¹⁾は、適当な金属イオン⁽²⁾を用いたキレート樹脂に通すと特異的に配位結合し、トラップされる。配位したHis-tag-タンパク質はイミダゾールなどの配位子となる物質を流すと溶出してくる。通常この操作はステップワイズに行われる。しかし、ステップワイズでは、非特異的なタンパク質の混入は避けられず、その後の精製操作を余儀なくされる場合も多い。そこで、His-tag-タンパク質の溶出を、イミダゾールの直線的濃度勾配法により行った。今回の実験では、His-tag-タンパク質として溶連菌NusG⁽³⁾由来のHis-tag-NusGタンパク質を用いた。また、キレート樹脂として、東ソー・TSKgelバイオアシストキレートカラムを用い、金属イオンとしてコバルトイオンをキレートして行った。その結果、より不純物の少ない良好なHis-tag-タンパク質標品が得られ、また、2量体、3量体及び4量体などオリゴマーの分離も可能であることが判明したので報告する。

実験材料と方法

1. TSKgelバイオアシストCo²⁺-キレートカラムの調製

TSKgelバイオアシストキレートカラム(東ソー, 7.8mm I.D. x 5cm)を、室温でBuffer A (20mMリン酸ナトリウム緩衝液, pH 7.4, 0.01%ナトリウムアジド含有)で洗浄後、3ml 0.1M塩化コバルト(CoCl₂)水溶液を流速0.5ml/minで流し、コバルトイオンを配位させた。

その後、Buffer B (20mMリン酸ナトリウム緩衝液, pH 7.4, 500mMイミダゾール及び0.01%ナトリウムアジド含有)で十分洗浄してTSKgelバイオアシストCo²⁺-キレートカラムを調製した。

2. His-tag-NusGタンパク質の発現系

C群レンサ球菌(GCS)である*Streptococcus dysgalactiae* *equisimilis* H46A株由来のNusGタンパク質のORF (543bp, 181amino acids, no cysteine: unpublished)を、N-terminus pQEベクター(pQE30, QIAGEN社)のBamHI-KpnIサイトに導入した。このNusGタンパク質発現ベクターを大腸菌(XL1-blue)に形質転換することにより発現クローン(HTNG-23)を作製し、N末端6 x His-tag-タンパク質として大量発現させた。

3. His-tag-NusGタンパク質粗抽出液の調製

HTNG-23を1リットルのLB液体培地中、600nmにおける吸光度が0.6に達するまで37℃で培養後、1mM IPTGを添加して3時間培養した。菌体を遠心により集めて、20ml BugBuster Protein Extraction Reagent (Novagen社)を加えてHis-tag-NusGを抽出した。その後、低温で遠心分離(10,000g x 10min)し、上清画分を回収して、上記Buffer A, 1リットルに対して一晚低温で透析した。透析後、不溶物を遠心分離により除き、His-tag-NusGタンパク質の粗抽出液とした。

4. His-tag-NusGタンパク質粗抽出液のTSKgelバイオアシストCo²⁺-キレートクロマトグラフ

3ml His-tag-NusGタンパク質粗抽出液(13.4mgタンパク質/ml)をバイオアシストCo²⁺-キレートカラムに室温で流速1ml/minで流した。20分間カラムをBuffer Aで洗浄後、20～50分の間、イミダゾール濃度(0～250mM)の直線的濃度勾配をかけ、His-tag-NusGタンパク質を溶出した。タンパク質の溶出パターンは280nmにおける吸光度をモニターして求めた。フラクションは1チューブあたり1mlずつ集めた。タンパク質の定量は牛血清アルブミン(BSA)を標準として、Coomassie Protein Assay Reagent (Rierce社)を用いて色素結合法⁽⁴⁾により求めた。

5. ドデシル硫酸ナトリウム・ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

タンパク質の電気泳動はLaemmliの方法⁽⁵⁾に従って行った。ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 存在下、15% ポリアクリルアミドゲルを作製して泳動した。タンパク質溶液は、 β -メルカプトエタノールを用いた還元条件下で SDS 存在下加熱変性処理して用いた。電気泳動後、ゲル中のタンパク質は、Coomassie Brilliant Blue R-250 の酸性溶液に漬けて染めた。分子量マーカーとして、Low Molecular Weight Calibration Kit (Amersham社) を用いた。

6. His-tag-NusGタンパク質のサイズ排除クロマトグラフ

精製した His-tag-NusG タンパク質の分子量を測定する目的で、TSKgel バイオアシスト G3SWxL (東ソー, 78mm I.D. x 30cm) を用いてサイズ排除クロマトグラフを行った。クロマトグラフは、サンプル100マイクロリットルを注入し、0.1M リン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.4, 0.01% ナトリウムアジドを用いて、流速0.5 ml/minで行った。タンパク質の溶出パターンは280nm における吸光度をモニターして求めた。標準タンパク質として、BSA (単量体: 66kDa, 2量体: 132kDa, 3量体: 198kDa), 卵白アルブミン (OV, 単量体: 43kDa, 2量体: 86kDa) 及びリゾチーム (14.4kDa) を用いた。

7. His-tag-NusGタンパク質単量体および2量体の再 Co^{2+} -キレートクロマトグラフ

図1で精製した His-tag-NusG タンパク質単量体 (フラクションNo.32) および2量体 (フラクションNo.37) の200マイクロリットルを、1リットルのBuffer Aに4℃で一晩透析した。それぞれの透析サンプルは、先と同様にバイオアシスト Co^{2+} -キレートカラムに室温で流速1ml/minで流した。5分間カラムをBuffer Aで洗浄後、5~35分の間、イミダゾール濃度 (0~250mM) の直線的濃度勾配をかけ、His-tag-NusG タンパク質を溶出した。タンパク質の溶出パターンは280nm における吸光度をモニターして求めた。

結果と考察

His-tag-NusG タンパク質の粗抽出画分をTSKgel バイ

オアシスト Co^{2+} -キレートクロマトグラフで精製した結果を図1に示した。イミダゾールの直線的濃度勾配をかけることにより、70mMでタンパク質成分をあまり含まない小さなピークが現れ、その後85mMのところでは大きなピークが溶出し、順次130mM, 170mM, 200mMのところでは次第に小さくなるピークが現れた。色素結合法によりタンパク質を検出及び定量した結果、これら後4つのピークは、そのピークの高さに比例してタンパク質が検出された (図2)。また、SDS-PAGE による分析 (図3) から、これら4つのピークは同一分子量 (23kDa) をもつ His-tag-NusG タンパク質であることが確認された。これらの結果から、His-tag-NusG タンパク質は少なくとも4種類の複合体を形成していると考えられた。

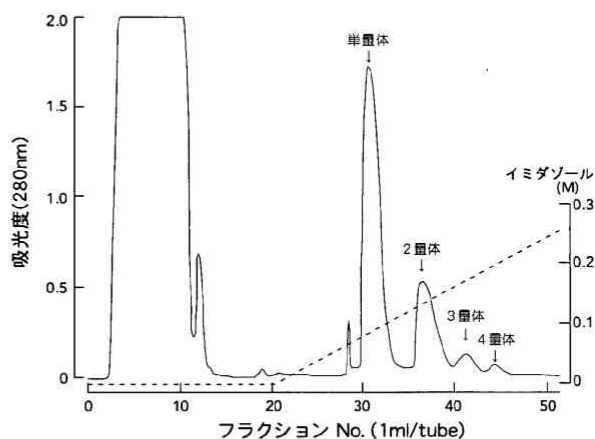


図1. His-tag-NusGタンパク質粗抽出画分TSKgelバイオアシスト Co^{2+} -キレートクロマトグラフ

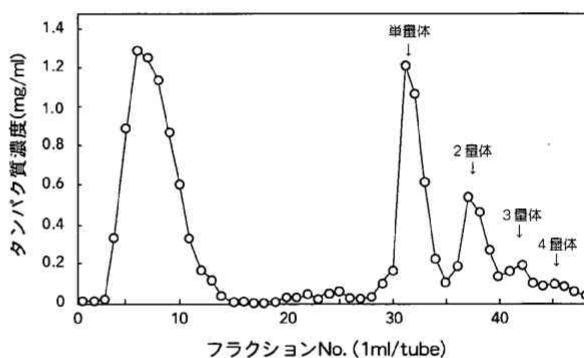


図2. His-tag-NusGタンパク質粗抽出画分TSKgelバイオアシスト Co^{2+} -キレートクロマトグラフのタンパク質定量

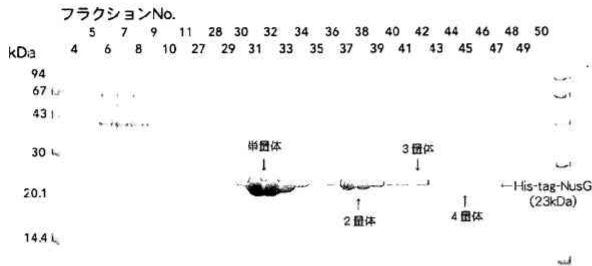


図3. His-tag-NusGタンパク質粗抽出画分TSKgelバイオアシスト Co^{2+} -キレートクロマトグラフのSDS-PAGE

上記4つの複合体の分子サイズを調べる目的でTSKgelバイオアシストG3SWxLを用いたゲル濾過クロマトグラフを行った。その結果を図4に示した。図1のフラクションNo.32のHis-tag-NusGタンパク質は、ほぼシンメトリな一つのピークとして溶出してきた。フラクションNo.37では、単一のピークであるがやや後にテーリングがみられた。フラクションNo.42では明らかに3つのピークがみられ、後2つのピーク位置は、フラクションNo.32及びフラクションNo.37のそれぞれのピーク位置に一致していた。同様にフラクションNo.46では、4つのピークがみられ、後3つのピークはフラクションNo.32, No.37およびNo.42のそれぞれのピーク位置に一致していた。そこで各フラクションNo.32, No.37, No.42およびNo.46の先頭のピークの溶出時間から、それぞれの分子サイズを求めたのが図5である。その結果、各ピークの分子サイズは順に23, 42, 60及び

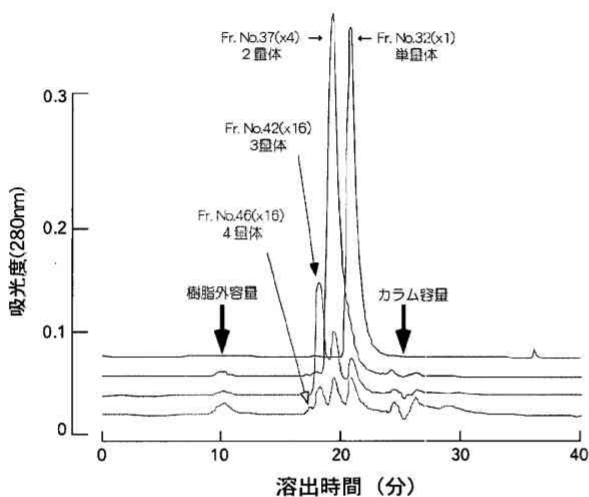


図4. His-tag-NusGタンパク質単量体, 2量体, 3量体及び4量体のTSKgelバイオアシストG3SWxLサイズ排除クロマトグラフ

76 kDaと見積られた。以上の結果から、図1のフラクションNo.32をピークとするタンパク質はHis-tag-NusGタンパク質の単量体と判明した。そして、その後につづくピークはそれぞれ、2量体, 3量体及び4量体であると考えられた。

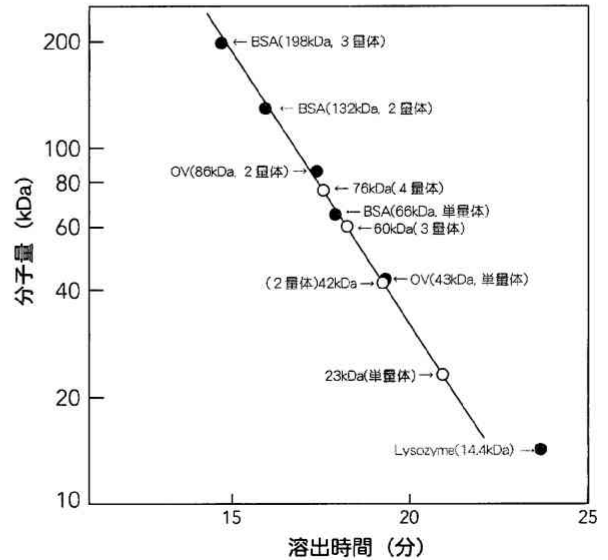


図5. His-tag-NusGタンパク質単量体, 2量体, 3量体及び4量体の分子サイズ

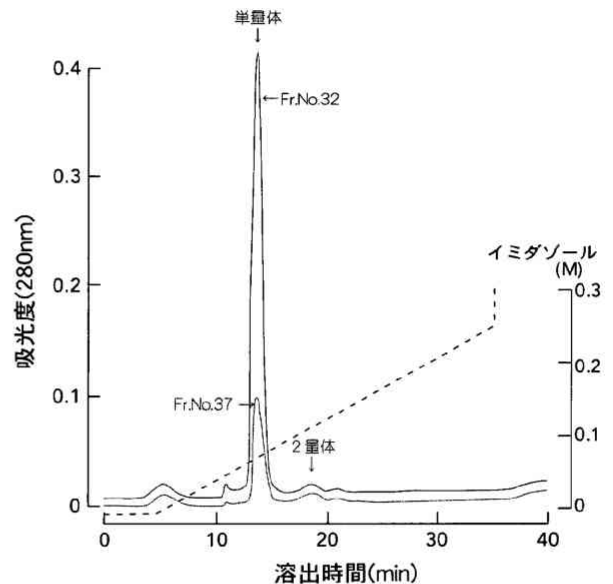


図6. His-tag-NusGタンパク質単量体および2量体の再 Co^{2+} -キレートクロマトグラフ

His-tag-NusGタンパク質は少なくとも単量体～4量体までのオリゴマーを形成する能力を持っていると思われる。オリゴマーを形成することで、1複合体分子あたりのHis-tagの数も増えることになる。このことが、キレート樹脂との親和性を高めることになり、より高濃度のイミダゾールでなければ樹脂から溶出しないものと考えられた。また、His-tag-NusGタンパク質にはシステイン残基がないためジスルフィド結合によるオリゴマー形成とは考えられず、従って、これらオリゴマーはタンパク質相互による化学平衡状態にあるものと考えられた。2量体を低温で、長時間おくと、単量体に解離することが明らかになった(図6)。図4および図5の結果も考え合わせると、本タンパク質は少なくとも4量体まで会合分子を形成でき、単量体優位の化学平衡状態にあることが明らかになった。

謝辞

各種TSKgelカラム及び技術情報を快く提供してくださった東ソー株式会社・計測事業部の村中和昭氏、三苦恵民氏および富澤洋氏に深く感謝します。

参考論文

1. Ford, C.F., Suominen, I. And Glatz, C.E., (1991) Protein Expr. Purif. 2, 95-107.
2. Liu, H.L., Ho, Y. and Hsu, C.M. (2003) J. Biomol Struct. Dyn. 21, 31-41.
3. Mason, S.W. and Greenblatt, J. (1991) Genes Dev. 5, 1504-1512.
4. Bradford. M.M. (1976) Anal. Biochem. 72, 248-254.
5. Laemmli, U.K. (1970) Nature 227, 680-685.